

ISBN : 978-602-73556-0-6

*Pertemuan Ilmiah Tahunan
Perhimpunan Mikrobiologi
Indonesia 2015*

C 42

**"Kontribusi mikroba dalam meningkatkan
kualitas hidup manusia"**

Proceeding

Editor :

Hermin Pancasakti Kusumaningrum

Lindayani

Siti Nurjannah

MG. Isworo Rukmi

Indra Gunawan



Semarang, 8-9 Oktober 2015
Hotel Patra Jasa Semarang

PROSIDING

PERTEMUAN ILMIAH TAHUNAN 2015

PERHIMPUNAN MIKROBIOLOGI INDONESIA

`Kontribusi Mikroba dalam Meningkatkan Kualitas Hidup Manusia''

Penulis :

Prof. Johannes F. Imhoff dkk

ISBN :

978-602-73556-0-6

Editor

Hermin Pancasakti Kusumaningrum

Lindayani

Siti Nurjannah

MG. Isworo Rukmi

Indra Gunawan

Desain Sampul

Teguh Wibowo

Ossep Syaifullah

Penerbit

Perhimpunan Mikrobiologi cabang Semarang

Sekretariat

Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika

Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Sudharto, SH Tembalang, Semarang 50275

Telp./Fax 024 76480923

Cetakan Pertama, Oktober 2015

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

Dilarang keras memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk dan dengan cara apapun

Tanpa izin tertulis dari penerbit

Bioactivity of Sea Cucumber *Holothuria impatiens* Extract against Multi Drug Resistant (MDR) Bacteria Bioaktivitas Ekstrak Teripang *Holothuria Impatiens* Terhadap Bakteri Multi Drug Resistant (MDR)

Delianis Pringgencies, Krisantika Titianita, Ali Ridho

Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

Jl. H. Prof. Sudarto, SH. Tembalang, Semarang, Indonesia 50275

Email: pringgencies@undip.ac.id

Abstract

Resistance of bacteria against some group of antibiotic has become a problem in medical world. Many researches were done to find the antibiotics that have activity against resistant bacteria. The oceans are one potential source of bioactive compounds with antibacterial activity. Sea Cucumber is one of marine invertebrates that have bioactive compounds and can be used in pharmacy. It has known that sea cucumbers bioactive compounds that can be used as antibacterial, antiviral, antifouling and antiinflammation. The aim of this research was to identify the fraction of *Holothuria impatiens* extract which have antibacterial activity to Multi Drug Resistant Bacteria and to identify the compound as antibacterial agent. Analysis of samples of sea cucumbers includes extraction, fractionation, and analysis of bacterial sensitivity test Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS), the extraction process is carried out by solid-liquid extraction method (solid-liquid). Fractionation is done with Open Column Chromatography (KKT). Test sensitivity of bacteria using the agar diffusion method according to the Kirby-Bauer. Result showed that the fractionation process have 5 fractions, such as fraction I, II, III, IV, and V. The Third fraction showed antibacterial activity against *Enterobacteria* strain 10 with diameter of inhibitory zone was 12.19 ± 0.42 mm. The second fraction showed antibacterial activity against *Klebsiella* sp. with diameter of inhibitory zone was 11.91 ± 0.98 mm. Based on the diameter of inhibitory zone, the second fraction was selected. GCMS analyzed showed 11 peaks with 6 identified peaks. The identified compounds were Methyl Butiric Acid, Butanoic Acid, Butyl Glycol Acetat, Benzeneacetic Acid,

Key Word : *Holothuria impatiens*, Multi Drug Resistant (MDR) bacteria, extraction, bioactivity

1. PENDAHULUAN

Bakteri resisten pada dasarnya muncul karena **J:lan a** penggunaan antibiotik dalam jangka waktu **3:anz** panjang dan semakin meningkat. Tidak **z:rkendalnya** penggunaan antibiotik cenderung akan **=eninekatkan** resistensi kuman yang semula sensitif **.Kadarwati et al** (1989). Tumbuhan dan **larIroorganisme** darat menghasilkan sumber bahan **112m yang** banyak digunakan sebagai agen terapi. Lebih dari 50% dari obat penyakit pada manusia ***rasal** dari sumber bahan alam. Seperti aspirin **l=rsumber** dari kulit pohon willow), antibakteri seperti *Penicilin* dan *Streptomycin* (dari **tric: oorganisme**). Sementara bahan alam dari laut **banyak** digunakan.. Salah satu dari hewan laut **inriz** potensi adalah hewan invertebrata laut karena **dai:rat** menghasilkan senyawa kimia yang salah satu **ferbninya** adalah untuk mencegah infeksi bakteri **iliarper et al** (2001). Echinodermata merupakan **ialah** satu invertebrata laut dan yang dapat Teripang **strupakan** kelompok Echinodermata yang secara **bors** dimanfaatkan dan diperdagangkan **L..stnimohtarto dan Juwana** (2001). Teripang tersebar di seluruh lautan di berbagai belahan dunia dan beberapa jenisnya seperti jenis *Stichopus variegates*,

S. chloronatus, *S. herrmanni*, *Bohadschia argus*, *B. mamorata* sudah diketahui memiliki aktifitas terhadap bakteri multi drug resistant (MDR) (Pringgencies, 2013). Berbagai informasi dilaporkan bahwa metabolit sekunder teripang dapat digunakan sebagai antivirus, antikanker, antibakteri dan sebagainya. *Holothurin*, suatu toksin yang terdapat pada teripang *Actynopyga agassizii*, yang dikenal sebagai *steroid glycoside* atau saponin. Zat ini bersifat sangat toksik bagi hewan lain dan mempunyai efek antitumor (Ha *dklc*, 197shomoto. Y. 9). Selanjutnya penelitian yang dilakukan oleh Bakus (1973), *Holothuria impatiens* selain sebagai biota penghias akuarium juga mempunyai senyawa toksik yang dapat membunuh ikan. Sun *et al* (2007) menambahkan bahwa biota ini mempunyai kandungan senyawa *impatienside A* dan *bivittoside D* yang berpotensi sebagai antikanker.

Dengan adanya potensi teripang *H. impatiens* sebagai antikanker, diduga teripang ini juga memiliki potensi sebagai antibakteri, terutama sebagai antibakteri MDR. Berdasarkan hal tersebut, maka tujuan penelitian adalah untuk mengetahui fraksi

ekstrak *H. impatiens* yang aktif terhadap bakteri *Multi Drug Resistant* dan sekaligus mengetahui jenis senyawa pada fraksi ekstrak *H. impatiens* yang berpotensi sebagai antibakteri.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Preparasi Sampel dan Ekstraksi

Sample teripang *H. impatiens* diambil dari perairan Bandengan, Jepara sebanyak 55 ekor. Sampel yang didapatkan dicuci dengan air bersih sehingga biota terlepas dari kotoran dan substrat yang menempel (Mojica *et al.*, 2008). Teripang dibedah untuk mengeluarkan organ dalamnya kemudian ditimbang dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 45 °C selama 4 hari. Sampel yang telah kering kemudian ditimbang dan dipotong kecil dengan ukuran ± 1 cm.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode ekstraksi padat cair dengan perendaman atau maserasi (Kristanti dan Aminah, 2008). Sampel kering sebanyak 224 g dimaserasi dalam erlenmeyer 1000 mL menggunakan pelarut n-heksan hingga semua bagian sampel terendam (Rifai dan Trianto, 2003). Sampel direndam selama 24 jam sambil sesekali diaduk, selanjutnya dilakukan penyaringan (Kristanti dan Aminah, 2008). Ampas sisa penyaringan direndam kembali menggunakan pelarut yang sama dengan perlakuan yang sama. Proses ini dapat dilakukan berulang-ulang beberapa kali hingga rendaman menjadi jernih (Kristanti dan Aminah, 2008). Hasil saringan ini dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40 °C (Trianto *et al.*, 2004). Ekstrak dikeluarkan dari *flask* dengan menggunakan spatula kemudian ditampung dalam vial dan disimpan dalam lemari pendingin. Selanjutnya, ampas rendaman pelarut n-heksan direndam kembali menggunakan etil asetat dan metanol secara berurutan dengan perlakuan yang sama.

Menurut Kristanti dan Aminah (2008), berat ekstrak dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\begin{aligned} W_e &= W_{v_2} - W_{v_1} \\ \text{dimana: } W_e &= \text{berat ekstrak} \\ W_{v_1} &= \text{berat vial kosong} \\ W_{v_2} &= \text{berat vial setelah diisi ekstrak} \end{aligned} \quad (1)$$

dan persen kandungan ekstrak dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\begin{aligned} Ce &= \frac{W_e}{W_s} \times 100 \% \\ \text{dimana : } Ce &= \text{persen berat kandungan ekstrak dalam sampel} \\ W_e &= \text{berat ekstrak} \\ W_s &= \text{berat sampel} \end{aligned} \quad (2)$$

2.2 Uji Kontrol Positif dan Negatif

Uji kontrol positif dan negatif dilakukan dengan menggunakan menggunakan metode difusi agar Kirby-Bauer (Brooks *et al.*, 2001). Uji kontrol positif bertujuan untuk mengetahui kemampuan hambatan antibiotik komersil sehingga dapat dibandingkan dengan kemampuan hambatan ekstrak dari *H. impatiens*. Antibiotik komersil yang digunakan adalah *Amoxicilin* dan *Streptomycin*. Konsentrasi antibiotik untuk uji kontrol positif adalah 20 gg/disk (Nagarajappa and Goswami, 2007). Uji kontrol negatif dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pelarut terhadap bakteri uji (Mojica *et al.*, 2007). Uji kontrol negatif dilakukan dengan menggunakan ketiga pelarut yakni n-heksan, etil asetat, dan metanol. Masing-masing *paper disk* diteteskan dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol sebanyak 10 gl.

2.3 Uji Aktivitas Ekstrak Terhadap Bakteri MDR

Uji aktivitas ekstrak sebagai antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar Kirby-Bauer (Brooks *et al.*, 2001). Uji aktivitas menggunakan ekstrak dari ketiga pelarut yakni n-heksan, etil asetat dan metanol terhadap bakteri uji. Uji aktivitas ekstrak dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari masing-masing ekstrak pelarut serta mengetahui bakteri yang akan digunakan untuk uji aktivitas fraksi.

Media kultur bakteri yang digunakan adalah NB (*Nutrien Broth*) dan diinkubasi selama 24 jam. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 5 gg/disk, 10 gg/disk, 20 gg/disk, 40gg/disk, 80 gg/disk, dan 160 gg/disk (Nagarajappa and Goswami, 2007).

Bakteri diratakan pada media agar dalam cawan petri menggunakan lidi berkapas yang direndam dalam inokulum selama beberapa detik kemudian diratakan pada permukaan media agar dan diamankan selama lima menit (Lay, 1994). *Paper disk* diletakkan di atas media agar yang telah diberi bakteri dengan menggunakan pinset. Uji aktivitas ekstrak dilakukan dengan meneteskan ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol pada masing-masing *paper disk* sebanyak 1 Ou.L. Pengukuran zona hambat dilakukan setelah 24 jam (Mojica *et al.*, 2007). Ekstrak yang paling banyak menghambat bakteri uji selanjutnya difraksinasi dengan menggunakan kromatografi. Selanjutnya pelaksanaan penelitian meliputi Kromatografi lapis Tipis (KLT), uji aktivitas fraksi terhadap bakteri uji, dan analisis GC-MS.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Uji Kontrol Positif dan Uji Kontrol Negatif

Hasil uji kontrol positif menunjukkan bahwa bakteri uji telah resisten terhadap antibiotik *Amoxicilin*. Hal ini terlihat dengan tidak adanya zona hambat yang terbentuk, sedangkan untuk antibiotik *Streptomycin* terlihat adanya zona hambat yang terbentuk, namun bakteri uji tetap dikatakan resisten. Hasil uji kontrol positif disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh Antibiotik Terhadap Bakteri MDR

Bakteri Uji	Diameter Zona Hambat (mm)	
	<i>Amoxicilin</i>	<i>Streptomycin</i>
<i>Eschericia Coli</i>	0	8,40
<i>Pseudomonas sp</i>	0	8,10
<i>Klebsiella sp</i>	0	8,89
<i>Coagulase Negative Stapylococus</i>	0	7,24
<i>Enterobacter Strain 5</i>	0	7,99
<i>Enterobacter Strain 10</i>	0	8,72

Hasil uji kontrol negatif menunjukkan bahwa pelarut tidak berpengaruh terhadap bakteri uji. Hal ini ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona

hambat di sekitar *paper disk*. uji kontrol negatif disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh Pelarut Terhadap Bakteri MDR

Bakteri Uji	Diameter Zona Hambat (mm)		
	n-Heksan	Etil asetat	Metanol
<i>Eschericia Coli</i>	0	0	0
<i>Pseudomonas sp</i>		0	0
<i>Klebsiella sp</i>		0	0
<i>Coagulase Negative Staphylococcus</i>		0	0
<i>Enterobacter Strain 5</i>			0
<i>Enterobacter Strain 10</i>		0	0

3.2 Uji Aktivitas Ekstrak Terhadap Bakteri MDR

Hasil uji aktivitas menunjukkan bahwa ekstrak **denzan** pelarut etil asetat memiliki aktivitas

antibakteri terhadap empat strain bakteri uji. Bakteri *Klebsiella sp.* dan

Enterobacter strain 10 merupakan bakteri yang paling sensitif terhadap ekstrak etil asetat, dengan zona hambat 10, 95 cm untuk *Klebsiella sp* dan 11,46 cm untuk *Enterobacter strain 10*. Hasil uji aktivitas aktivitas antibakteri disajikan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Uji Aktivitas Ekstrak *H. Impatiens*

Bakteri Uji	Diameter Zona Hambat (mm)		
	n-Heksan	Etil asetat	Metanol
<i>Ecoli</i>	0	7,30	0
<i>Pseudomonas sp</i>	0	0	9,18
<i>Coagulase Negative Staphylococcus</i>	0	0	8,62
<i>Kkbsiella sp</i>	0	10,95	0
<i>Entero Strain 5</i>	0	10,88	0
<i>Eruero Strain 10</i>	0	11,46	11,40

3.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT dilakukan untuk mengetahui pelarut yang tepat untuk pemisahan fraksi ekstrak pada Kromatografi Kolom Terbuka. Hasil perbandingan

pelarut yang optimal untuk pemisahan senyawa pada ekstrak etil asetat adalah campuran etil asetat dan klorofom dengan perbandingan 1:1. Hasil KLT disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Perbandingan Pelarut untuk Fraksinasi Ekstrak Etil Asetat dalam KLT

Pelarut	Perbandingan	Jumlah Spot	Rf
Klorofom	1 : 0	1	0,82 ; 0,74 ; 0,43
Metanol	1 : 0	1	0,7
n-Heksan	1 : 0	1	1
Klorofom : Etil asetat	2:1	4	0,66;0,74;0,81;0,93
Klorofom : Etil asetat	1:1	4	0,51;0,72;0,77;0,88
n-Heksan : Etil asetat	3:2	3	0,30;0,69;0,97
n-Heksan : Etil asetat	1:2	2	0,79;0,95
n-Heksan : Etil asetat	2:1	3	0,7;0,38;0,97
Etil asetat : Metane:	1:1	1	1
Klorofom : Metanol	1 : 1	1	0,86
Klorofom : n-Heksan	2 : 1	1	0,93

3.4 Kromatografi Kolom Terbuka (KKT)

Pemisahan fraksi ekstrak etil asetat menghasilkan 5 fraksi dari 20 vial dengan volume masing-masing vial 5 mL. Hasil fraksinasi

dikelompokkan berdasarkan kesamaan pola spot. Visualisasi spot menggunakan lampu UV. Fraksi dengan berat paling besar adalah fraksi II, yaitu 0,039 g sedangkan fraksi paling sedikit adalah fraksi V sebanyak 0,017 g. Hasil pemisahan fraksi ekstrak dan nilai **Rf** ditampilkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Pengelompokan Fraksi dengan Kromatografi Kolom Terbuka

Nomor Vial	Berat (gr)	Rf	Fraksi
1 - 2	0,036	0,944 ; 0,935	II
3 - 4	0,039	0,961 ; 0,879	
5 - 6	0,021	0,982 ; 0,965	III
7 - 11	0,019	0,859 ; 0,889 ; 0,821 ; 0,834 ; 0,869	IV
12 - 17	0,017	0,777 ; 0,833 ; 0,784 ; 0,784 ; 0,939 ; 0,799	V

3.5 Uji Aktivitas Fraksi Terhadap Bakteri *Klebsiella* Sp. dan *Enterobacter* Strain 10

Hasil Uji Aktivitas Fraksi I - V Terhadap Bakteri *Klebsiella* sp. Tertera pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji Aktivitas Fraksi I - V Terhadap Bakteri *Klebsiella* sp.

Fraksi	Diameter Zona Hambat (mm)		
	24 Jam	48 Jam	72 Jam
20 gg/disk	8.73 ± 0.46	10.43 ± 0.98	7.84 ± 0.24
11	8.66 ± 0.46	9.15 ± 0.47	9.09 ± 0.97
III	8.78 ± 0.35	9.74 ± 0.67	8.63 ± 0.53
IV	8.47 ± 0.94	8.73 ± 0.76	8.51 ± 0.92
V	8.16 ± 0.82	7.81 ± 0.25	7.32 ± 0.50
40 gg/disk	10.81 ± 0.87	10.95 ± 0.32	9.85 ± 0.82
II	11.41 ± 0.96	11.23 ± 0.95	10.42 ± 0.58

60 pg/disk	m	10.53 ± 0.82	10.19 ± 0.61	10.32 ± 0.64
	IV	10.14 ± 0.19	10.12 ± 0.62	9.84 ± 0.37
	V	8.40 ± 0.93	9.66 ± 0.97	8.90 ± 0.73
		10.64 ± 0.89	10.99 ± 0.54	10.38 ± 0.96
	II	11.91 ± 0.98	11.74±0.97	10.76 ± 0.89
	m	10.76 ± 0.99	11.36±0.96	10.91 ± 0.79
	IV	10.34 ± 0.99	10.11 ± 0.81	10.17 ± 0.99
		9.10 ± 0.52	8.38 ± 0.98	8.53 ± 0.38

Keterangan : Rata-rata ± Standart Deviasi

Uji aktivitas fraksi terhadap bakteri *Enterobacter* strain 10 tampak pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Uji Aktivitas Fraksi 1- V Terhadap Bakteri *Enterobacter* strain 10

Kosentrasi	Fraksi	Diameter Zona Hambat (mm)		
		24 Jam	48 Jam	72 Jam
20 pg/disk		9.82 ± 0.54	10.19 ± 0.82	10.22 ± 0.42
		10.52 ± 0.62	10.50 ± 0.81	10.84 ± 0.65
	III	10.56 ± 0.46	10.91 ± 0.64	10.75 ± 0.67
	iv	10.80 ± 0.77	11.00 ± 0.85	11.17± 0.11
		10.02 ± 0.93	9.83 ± 0.80	8.41 ± 0.80
40 gg/disk		10.97 ± 0.90	12.08 ± 0.73	11.71 ± 0.85
	II	10.93 ± 0.44	10.91 ± 0.96	10.54 ± 0.23
		11.75 ± 0.94	11.34±0.93	11.42 ± 0.48
	IV	9.95 ± 0.27	10.15 ± 0.57	10.20 ± 0.70
		9.18 ± 0.45	8.87 ± 0.33	8.96 ± 0.25
60 gg/disk		10.24 ± 0.74	10.08 ± 0.27	10.03 ± 0.91
	II	11.05 ± 0.72	11.92 ± 0.72	11.33 ± 0.32
	III	12.19 ± 0.42	12.07 ± 0.62	11.78 ± 0.74
	IV	10.71 ± 0.89	10.86 ± 0.47	10.46 ± 0.88
	V	8.17 ± 0.74	8.11 ± 0.60	9.20 ± 0.59

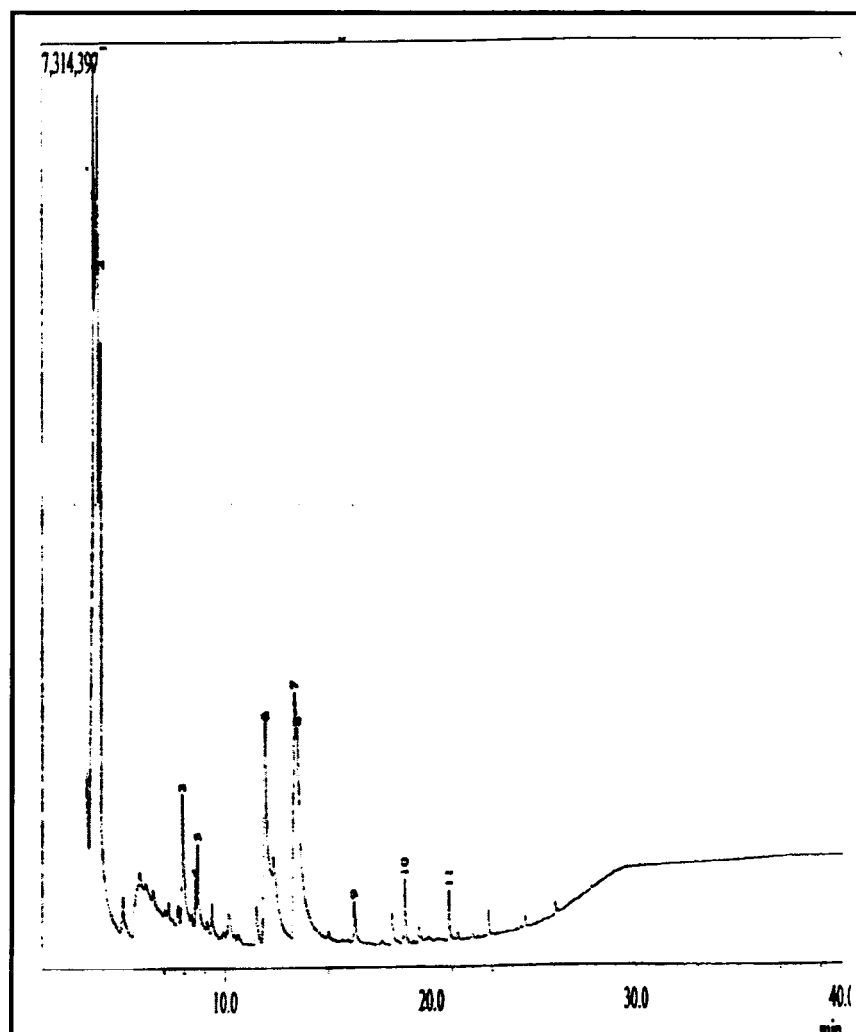
Keterangan : Rata-rata ± Standart Deviasi

Fraksi yang diperoleh dari Kromatografi Kolom Terbuka diujikan terhadap bakteri *Klebsiella* sp. dan *Enterobacter* strain 10. Hasil uji aktivitas fraksi menunjukkan fraksi II merupakan fraksi yang paling aktif terhadap bakteri *Klebsiella* sp., sedangkan fraksi III merupakan fraksi yang paling aktif terhadap bakteri *Enterobacter* strain 10.

3.6 Analisis GC-MS

Analisis GC-MS dilakukan untuk menduga senyawa yang terkandung pada Fraksi II. Hasil GCMS fraksi II menunjukkan terbentuk 11 puncak senyawa, dengan 6 senyawa yang teridentifikasi.

Senyawa yang teridentifikasi ditampilkan pada Tabel 11 dan kromatogram dari GC-MS fraksi II ditampilkan pada Gambar 1.



I. Kromatogram Fraksi II Ekstrak Etil asetat

Gambar

Tabel 8. Senyawa Fraksi II Ekstrak Etil Asetat

Nomor Puncak	Waktu Retensi	Luas Puncak (%)	Indeks Kemiripan (SI)	Senyawa
1	3,535	23,59	88	Asam Metil Butirat
2	3,904	44,38	86	Asam 2-Metil Butanoat
3	7,894	3,39	96	2-Butoksi Etil Asetat
4	8,536	0,63		Tak Teridentifikasi
5	8,634	1,37		Tak Teridentifikasi
6	11,745	7,67	93	Asam Benzenaasetat
7	13,359	8,40	94	Asam Benzenapropionat
8	13,475	8,72	93	1-Pentadecena
9	16,256	0,32		Tak Teridentifikasi
10	18,703	0,86		Tak Teridentifikasi
11	20,775	0,67		Tak Teridentifikasi

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis GC-MS

Uji kontrol positif menunjukkan bahwa bakteri uji telah resisten terhadap antibiotik *Amoxicilin*, ini ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona hambat. Antibiotik *Streptomycin* meskipun menunjukkan zona hambat, namun menurut NCCLS jika zona hambatan antibiotik *Streptomycin* kurang dari 11 mm maka bakteri sudah tergolong resisten terhadap antibiotik tersebut.

Uji kontrol negatif dilakukan berdasarkan penelitian yang dilakukan Mojica *et al* (2007), dimana uji kontrol negatif dilakukan dengan menggunakan pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstrak. Uji kontrol negatif menunjukkan bahwa pelarut tidak menunjukkan adanya pengaruh terhadap pembentukan zona hambat. Hal ini dibuktikan dengan tidak terbentuknya zona hambat antara pelarut dengan bakteri uji.

Senyawa aktif antibakteri diduga sebagian besar terkonsentrasi pada pelarut semi polar, terlihat dengan banyaknya bakteri yang dapat dihambat oleh ekstrak dari pelarut etil asetat. Ekstrak etil asetat menunjukkan aktivitas antibakteri pada 4 spesies bakteri yakni *Klebsiella* sp., *Eschericia coli*, *Enterobacter* strain 5 dan *Enterobacter* strain 10, sedangkan ekstrak dari pelarut n-heksan tidak menampilkan aktivitas antibakteri sama sekali dan ekstrak dari pelarut metanol hanya menunjukkan aktivitas antibakteri pada tiga bakteri uji saja, yakni *Pseudomonas* sp., *Coagulase Negative Staphylococcus*, dan *Enterobacter* strain 10. Sesuai dengan Mojica *et al.* (2007) yang menyatakan, bahwa ekstrak teripang dari pelarut semi polar lebih berpotensi sebagai antibakteri dibandingkan dengan ekstrak dari pelarut non polar dan polar. Salah satu bakteri uji yang dapat dihambat pertumbuhannya oleh ekstrak dari pelarut metanol adalah bakteri *Coagulase Negative Staphylococcus*. Bakteri *Coagulase Negative Staphylococcus* merupakan bakteri gram positif. Dinding sel bakteri gram positif memiliki struktur yang banyak peptidoglikan dan sedikit mengandung lipid. Hartini *et al.* (2008) menerangkan, kepolaran ekstrak dari pelarut metanol inilah yang mengakibatkan senyawa ini mudah menembus dinding sel bakteri gram positif. Nursal *et al* (2006) juga menambahkan, bahwa pengaruh perbedaan daya hambat dari setiap ekstrak terhadap bakteri dapat disebabkan oleh faktor seperti perbedaan komponen dinding sel bakteri.

Kromatografi Lapis Tipis dilakukan untuk melihat kemurnian suatu senyawa organik (Kristanti *et al.*, 2008). Pemilihan perbandingan pelarut antara kloroform dan etil asetat pada proses KLT berdasarkan jumlah spot yang nampak pada plat

silika yang digunakan. Jumlah spot yang muncul menyatakan banyaknya komponen dalam ekstrak.

Gandjar *et al* (2007) menyatakan bahwa, KLT dilakukan untuk menentukan banyaknya komponen dalam campuran, identifikasi senyawa, memantau berjalannya suatu reaksi, menentukan efektifitas pemurnian, menentukan kondisi yang sesuai untuk kromatografi kolom serta memantau kromatografi kolom. Untuk itu setelah pelaksanaan proses KLT dilakukan kembali KLT untuk menentukan efektifitas pemurnian sehingga dapat digabungkan hasil tampungan yang mempunyai kemurnian yang sama.

Pada proses KLT digunakan lampu UV untuk visualisasi spot yang terdapat dalam silika. Metode visualisasi ini digunakan untuk menampilkan spot jika yang dipisahkan bukan senyawa yang berwarna. Beberapa senyawa akan nampak sebagai spot yang berpendar. Menurut Kristanti *et al.* (2008), metode UV digunakan untuk senyawa yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi atau aromatis.

KKT dilakukan untuk memisahkan komponen yang terdapat dalam ekstrak sesuai dengan sifat kepolarannya. Fraksi V merupakan fraksi paling polar dibandingkan fraksi yang lainnya. Sedangkan Fraksi I adalah fraksi yang relatif bersifat non polar karena merupakan tampungan eluen yang pertama. Kromatografi kolom terbuka memisahkan komponen dari suatu campuran berdasarkan tingkat kepolarannya. Hal ini sesuai dengan Kristanti *et al* (2008), yang menyatakan bahwa molekul-molekul senyawa akan dibawa sebagian bawah kolom dengan kecepatan yang bervariasi bergantung pada besarnya afinitas molekul tersebut dalam adsorben dan juga pada besarnya kelarutan molekul tersebut dalam pelarut.

Konsentrasi yang digunakan untuk uji aktivitas fraksi adalah 20 gg/disk, 40 gg/disk, dan 60 gg/disk. Pemilihan konsentrasi didasarkan dari hasil uji aktivitas ekstrak yang menunjukkan adanya aktivitas terhadap bakteri uji pada konsentrasi terendah yakni pada konsentrasi 20 gg/disk.

Konsentrasi 60 gg/disk merupakan konsentrasi paling baik dalam menghambat bakteri *Klebsiella* sp. dan *Enterobacter* strain 10, ditunjukkan dengan luasnya diameter zona hambat yang terbentuk. Terlihat bahwa semakin bertambahnya konsentrasi fraksi, maka makin naik pula diameter zona hambat. Ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi berpengaruh terhadap pembentukan zona hambat. Sesuai dengan Harpeni (2007), semakin kecil ukuran diameter zona hambat maka semakin rendah sensitivitas bakteri. Ditambahkan pula oleh Schlegel (1994) dan Ajizah (2004), bahwa kemampuan suatu bahan antimikroba dalam meniadakan kemampuan hidup mikroorganisme tergantung pada konsentrasi bahan antimikroba itu.

Fraksi yang menunjukkan aktivitas paling baik adalah fraksi 11 terhadap bakteri *Klebsiella* sp. dan

Fraksi 111 terhadap bakteri *Enterobacter* strain 10. Ini menunjukkan bahwa senyawa antibakteri terdapat pada Fraksi II dan Fraksi III. Perbedaan zona hambatan yang dibentuk oleh fraksi, dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti sifat medium, kemampuan difusi, ukuran molekuler, dan stabilitas zat (Jawetz *et al.*, 2001).

Berdasarkan mekanisme kerja antibakteri dapat diasumsikan bahwa Fraksi II dan Fraksi III mekanisme kerjanya melalui penghambatan sintesis dinding sel, penghambatan fungsi membran sel atau melalui hambatan sintesis protein. Hal ini dapat dibuktikan juga dengan adanya resistensi yang terjadi pada kedua antibiotik pada uji kontrol positif. *Amoxicilin* merupakan golongan Penisilin yang bekerja melalui penghambatan dinding sel, sedangkan *Streptomycin* yang merupakan antibiotik golongan Aminoglikosida bekerja melalui hambatan sintesis protein (Volk dan Wheeler, 1993).

Fraksi yang mempunyai aktivitas paling baik, digunakan untuk proses GC-MS. Fraksi II merupakan fraksi terpilih untuk dianalisis menggunakan GC-MS. Penentuan fraksi yang terpilih didasarkan kemampuan fraksi dalam menghambat kedua bakteri uji. Hasil GC-MS diketahui bahwa pada fraksi II terdapat 11 puncak senyawa. Namun hanya enam senyawa yang teridentifikasi, yaitu Asam Metil Butirat, Asam 2-Metil Butanoat, 2-Butoksi Etil Asetat, Asam Benzenasetat, Asam Benzenapropionat, 1-Pentadecena.

Komponen utama dari fraksi II ini adalah Asam 2-Metil Butanoat dengan persentase komposisi paling tinggi (44,38). Beberapa dari senyawa yang teridentifikasi seperti Asam 2-Metil Butanoat dilaporkan oleh Oyedemi *et al.*, (2008) mempunyai aktivitas antibakteri. Asam Benzenasetat atau lebih dikenal sebagai Asam fenilasetat ini juga mempunyai kemampuan antibakteri (Kim *et al.*, 2004) dan antioksidan (Varma *et al.*, 2006). Dilaporkan juga oleh Hillenga *et al.* (1995), bahwa Asam Benzenasetat digunakan dalam pembuatan Penicilin G. Asam Benzenasetat mempunyai kemampuan untuk menembus membran plasma pada sel. Dapat diasumsikan bahwa mekanisme kerja dari Fraksi II adalah melalui penghambatan sintesis dinding sel, sesuai dengan yang dinyatakan dalam Jerivetz *et al.* (2001) bahwa mekanisme kerja penisilin adalah melalui penghambatan sintesis dinding sel. Ditambahkan pula oleh Katzung (2004), bahwa antibiotik beta-laktam melintasi membran luar dan memasuki organisme-organisme gram negatif melalui saluran protein membran luar.

5. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Pada konsentrasi 60gg/disk fraksi paling aktif terhadap bakteri *Klebsiella* sp. Ditunjukkan oleh fraksi II dengan diameter zona hambat 11.91 ± 0.98 mm dan fraksi paling aktif terhadap bakteri *Enterobacter* strain 10 ditunjukkan oleh fraksi III dengan diameter zona hambat 12.19 ± 0.42 mm;
2. Analisis dengan menggunakan GC-MS terhadap fraksi II didapatkan 6 komponen utama yaitu Asam Metil Butirat, Asam 2-Metil Butanoat, 2-Butoksi Etil Asetat, Asam Benzenasetat, Asam Benzenapropionat, 1-Pentadecena. Asam Benzenasetat dan Asam 2-Metil Butanoat dilaporkan mempunyai potensi sebagai antibakteri.

6. KEFERENSI DAN SITASI

- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas *Salmonella* Typhimurium Terhadap Ekstrak Daun *Psidium Guajava* L. Jurnal Bioscientiae., 1(1):31-38.
- Bakus, G.J., 1973. The Biology and Ecology of Tropical Holothurians In: Jones, O.A. and Endean, R (eds), Biology and Geology of Coral Reef. Vol II Biology I, Academic Press, New York, 326-36 p.
- Brooks, G.F., J.S. Butel, and S.A. Morse. 2001. Mikrobiologi Kedokteran. Salemba Medika, Jakarta, 528 hlm.
- Gandjar. I.B dan A. Rohman. 2007. Nimia Farmasi Analisa. Pustaka Relajar. Yogyakarta. 490 hlm.
- Hillenga, D. J, H.Versantvoort, S. van der Molen, A. Driessen, and W. N. Konings, 1995, Penicillium chrysogenum Takes up the Penicillin G Precursor Phenylacetic Acid by Passive Diffusion, Journal Appl Environ Microbio 161(7): 2589-2595
- Harpeni, E. 2007. Identifikasi Bakteri Karang Pendegradasi Senyawa Herbisida Paraquat (1,1-Dimethyl-4,4'-Bipyridilium Dichloride) di Pantai Utara Jawa. Dalam: Prosiding Seminar Hasil Penelitian & Pengabdian kepada Masyarakat, UNILA, pp. 255-262.
- Hartini, Y.S., C.J. Soegihardjo, A.I.C. Putri, M.I.A, Setyorini, dan D. Kurniawan. 2008. Daya Tahan Campuran Ekstrak Etanol Buah Adas (*Feoniculum vulgare* Miil) Dan Kulit Batang Pulasari (*Alyxia reimpvarchii* BL). <http://www.usd.ac.id> (2 September 2008)
- Hashimoto Yoshiro. 1(1979). Marine Toxins and Other Bioactive Marine Metabolites. Japan Scientific Societies Press, Tokyo. P. 369.

- Jawetz, E., J.L. Melnick and E.A. Adelberg. 2001. Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiology) Edisi 20. EGC, Jakarta. 753 hlm.
- Kadarwati, U, N.Sukasediati, R. Gitawati, dan R. Uci. 1989. Pola Resistensi Kuman Kokusterhadap Enam Jenis Antibiotika di wilayah Jakarta Timur. J. Cermin Dunia Kedokteran No. 56 1989.
- Kristanti, N dan S. Aminah. 2008. Buku Ajar Fitokimia Laboratorium Kimia Organik FMIPA. Airlangga. Surabaya
- Kim Y Cho JY, Kuk JH Moon JH Cho JI, Kim YC, and Park KH.. 2004, Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by *Bacillus licheniformis* isolated from fermented soybean Chungkook-Jang, *Journal Curr Microbiol*. 48(4):312-7
- Lay, Eiibiana W. 1994. Analisis Mikroba Di Laboratorium. PT. RajaGrafindo Persada. Jakarta
- Mojica, E.E. R.J., Layson. M.C.A, Rodil. C.C, Deocaris. Marine Invertebrates As Source Of Potential Antitumor and Antibacterial Agents. 2008. [http:// www.pcamrd.dost.gov.ph](http://www.pcamrd.dost.gov.ph) (22 November 2008)
- Na.2arajappa and U. Goswami. 2007. Antibacterial Peptide from Coelomic fluid of a Sea Cucumber. [http://www. nio.org](http://www.nio.org). (7 September 2007)
- Nursal, S. W. dan W. S. Juwita. 2006. Bioaktifitas Ekstrak Jahe (*Zingiber oijicinale* Roxb.) dalam Menghambat Pertumbuhan Koloni Bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. Jurnal Biogenesis Vol. 2 (2) :64-66.
- Oyedemi, S.O, G.Pirochenva, L.V Mabinya, G. Bradley, and A.J. Afolayan. 2008. Compositions and comparasions of antimicrobial potencies of some essential oil and antibiotic against selected bacteria. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (22): 4140 — 4146.
- Pringgenies. D. (2013). Antibacterial Activity of Sea Cucumbers Harvested From Karimunjawa. *Squalen, Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*. Vol. 8. No. 2 (2013). August 2013
- Reed, J.K. A.E.Wright, J.P.McCarthy, and S.A. Pomponi. 2005. Marine Biomedical Research A Search for New Pharmaceutical Drugs from Marine Organisms. <http://www.at-sea.org> (14 Desember 2008).
- Rifai, A dan A. Trianto. 2003. Penggunaan Thin Layer Chromatography Untuk Mengidentifikasi Kandungan Bahan Bioaktif Antibakteri *Vibrio harveyi* Pada Karang Lunak *Sarcophyton* sp.. Penelitian Dosen muda. 25 hlmn.
- Romimohtarto. K dan S. Juwana. 2001. Ilmu Pengetahuan Tentang Biota Laut.. Djambatan. Jakarta. 540 hlm.
- Sun P, Liu BS, Yi YH, Li L, Gui M, Tang HF, Zhang DZ, Zhang SL. 2007. A New Cytotoxic Lanostane-Type Triterpene Glycoside From The Sea Cucumber *Holothuria impatiens*. <http://www.nih.gov>.(1 Mei 2007).
- Siegel. J. D, E. Rhinehart, M. Jackson, and L. Chiarello,2006. Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings, 2006. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC):1 - 74
- Trianto A, Y. Yan, Ambariyanto, dan R. Nurwani. 2004. Uji Toksisitas Ekstrak Gorgonia *Isis hippuris* Terhadap Nauplius *Artemia salina*. Jurnal Ilmiah Pengembangan Ilmu-Ilmu Kelautan. Volume 9 (2): 61 - 66
- Wilson.C.O, and O. Gisvold. 1982. Textbook of Organic Medical and Pharmaceutical Chemistry. Happer and Row Publishers Inc. USA. Halaman 231 — 234